

出芽酵母Sgs1とTop3のDNA組換えにおける機能の解析

著者	宇井 彩子
号	336
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/15711

氏 名 (本籍) 宇 井 彩 子

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 博 第 3 3 6 号

学位授与年月日 平 成 15 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科、専 攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 生命薬学専攻

学 位 論 文 題 目

出芽酵母 Sgs1 と Top3 の DNA 組換えにおける機能の解析

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 榎 本 武 美

教 授 永 沼 章

教 授 中 畑 則 道

論文内容要旨

ブルーム症候群原因遺伝子 (*BLM*), ウエルナー症候群原因遺伝子 (*WRN*), ロスモンド-トムソン症候群原因遺伝子 (*RTS*) 産物は, 大腸菌の *RecQ* によく似たタンパク質で *RecQ* ヘリカーゼファミリーに属する。上記ヒト遺伝病はゲノム安定性の維持に欠陥があり, 本研究ではその原因を探るモデル生物として出芽酵母を用いた。出芽酵母には唯一の *RecQ* 遺伝子として *SGS1* が存在している。*SGS1* は初め, DNA トポイソメラーゼの一種である *TOP3* と遺伝学的及び物理的に相互作用する因子として同定された。これまでに, *sgs1* 変異株では自発的に生成する組換えの頻度が上昇し, DNA 傷害剤である MMS (methyl methanesulfonate) に感受性を示すことが報告されている。さらに当研究室小野田により *Sgs1* が “Rad52 相同組換え修復経路” に属することが示された。そこで本研究では, *Sgs1* と *Top3* にいかなる機能的な関係があるのか, 及び *Sgs1* がどのような相同組換え反応に関与しているかに焦点をあてて研究を行った。

1. *Sgs1* は N 末端領域を介して *Top3* と相互作用する

1994 年に *SGS1* が発見されて以来, *Sgs1* と *Top3* に何らかの関係があることは示唆されていたが, 具体的に *Sgs1* と *Top3* が細胞内のどのような過程に関与するのかは明らかになっていなかった。本研究では, *Top3* が *Sgs1* の N 末端領域 1-45 アミノ酸残基で相互作用することを見だし, この領域に複数のミスセンス変異を導入することで, *Top3* との結合能力を失った 12/13-G/S 変異 *SGS1* を作製した。この 12/13-G/S 変異 *SGS1* は, *sgs1* 変異株の “MMS 感受性”, “相同染色体間の組換え頻度亢進”, “姉妹染色分体間の組換え頻度亢進” などの表現型を相補できなかった。この結果より, *Sgs1* と *Top3* の結合は *Sgs1* が細胞内でその機能を遂行する上で不可欠であるということが初めて明らかになった。

2. *Sgs1* は DNA 修復過程に関与する

sgs1 変異株の示す MMS 感受性について 2 つの対立するモデルがある。ひとつは近年提唱されたもので, DNA 複製中に何らかの理由で複製フォークが停止すると, 新生鎖同士が巻き戻って Holliday junction 様の構造が生み出されるが, *Sgs1* はこの Holliday junction 構造を巻き戻して解消させるというものである。この Holliday junction 構造は Mms4-Mus81 複合体のもつヌクレアーゼ活性の基質でもあり, *sgs1* 株では *Sgs1* が機能しないため Holliday junction 構造が Mms4-Mus81 によって過剰に二本鎖切断に変換され, それが相同組換えの開始を促進するため組換え頻度が亢進する。この際, MMS などの DNA 傷害剤が存在すると *sgs1* 変異株では野性型に比べ “より致命的な過剰の二本鎖切断を被る” ため MMS 感受性になるというものである。もうひとつのモデルは, *Sgs1* は遺伝学的に Rad52 相同組換え修復経路に属するのだから, MMS によって生成した二本鎖切断等の DNA 傷害を修復する能力をもつというものである。この 2 つのモデルのいずれが正しいのかを, MMS で傷害を受けた細胞の染色体をパルスフィールドゲル電気泳動により直接観察することで検討した。その結果, MMS で短時間処理した直後の二本鎖切断の生成量は, 野性型と *sgs1* 株で差がなかった。一方, MMS を取り除いた後に MMS を含まない培地で培養して, 染色体サイズの

DNA の出現を指標に修復を観察すると, *sgs1* 変異株では *rad52* 変異株と同様に DNA 修復が起こらなかった。この結果より, Sgs1 は MMS による二本鎖切断が生じた後の修復過程に関与することが明らかとなった。

3. Sgs1 と Rad52, Ku70, Mre11 との関係

一般に, 二本鎖切断が生じると, この二本鎖切断は“Rad52 相同組換え経路”と“Ku70 が機能する非同相組換え経路”で修復され则认为られている。また“Rad52 が機能する相同組換え経路”は, さらに“Rad51 の機能に依存する経路”と“Rad51 の機能に依存しない経路”の大きく 2 つの経路に分類できる。このうち“Rad51 の機能に依存しない経路”において Mre11 が働いていると认为されている。ここで, Sgs1 は MMS により形成された二本鎖切断の修復過程で機能することがわかったので, Sgs1 と Rad52, Ku70, Mre11 との関係を遺伝学的に解析した。その結果, *sgs1 ku70* の二重変異株や *sgs1 mre11* 二重変異株での MMS 感受性は, それぞれ単独の変異株の MMS 感受性よりも高くなった。この結果より, Sgs1 と Ku70 及び Mre11 は異なる経路で機能していることが示された。また, Mre11 は相同組換えだけでなく非同相組換えにも関与していることから, 非同相組換えの影響を排除するために *ku70* 変異株において両遺伝子の関連を調べた。その結果, Ku70 の非存在下では *sgs1 mre11* 変異株の感受性は *rad52* 変異株の感受性にはほぼ一致した。このことは, Sgs1 が“Rad51 の機能に依存する経路”に属し, “Rad51 の機能に依存しない経路”に属す Mre11 とは独立した役割を Rad52 相同組換え経路の中で果たしていることを示唆している。

4. DNA 傷害時に Sgs1 と Top3 は協調して相同組換え反応を促進する

野生型の二倍体細胞では MMS に曝されると相同染色体間の組換え (HR) が誘導される。一方, 一倍体細胞においても MMS 存在下で姉妹染色分体間の組換え (SCR) の誘導が観察される。DNA 傷害によって誘導される HR や SCR は Rad52 相同組換え経路によって起こることが知られている。そこで, Sgs1 が MMS で誘導される HR や SCR の生成に関わっているか検討した。その結果, *sgs1* 変異株では MMS で誘導される HR や SCR が野生型に比べて著しく低下していることが明らかとなった。このことは Sgs1 が HR や SCR の反応に Rad52 メンバーの一員として機能していることを示している。この組換えの誘導の欠損は野生型 *SGS1* を *sgs1* 株に導入すると相補できたので, ヘリカーゼドメインを完全に欠質した Δ C852 (Sgs1 の N 末断片) と Top3 と結合できない変異 12/13-G/S を *sgs1* 株に導入して MMS で誘導される HR と SCR を測定した。Sgs1 のヘリカーゼドメインを完全に欠質しても *sgs1* の MMS の感受性が部分的に相補された。この Δ C852 のもつ MMS 感受性の部分的な相補は *sgs1 top3* 二重変異株や *sgs1 rad52* 二重変異株では観察されないことから, Δ C852 の機能は Top3 及び Rad52 の存在下に発揮されることが明らかになった。このヘリカーゼドメインがない Δ C852 が, MMS で誘導される HR や SCR の反応を促進できたことから, Sgs1 のヘリカーゼ活性は相同組換えに必ずしも必須ではないという新しい知見を得ることができた。一方, Top3 と結合できない 12/13-G/S は *sgs1* 株の MMS 感受性を全く相補できず, さらに MMS で誘導される HR や SCR を促進できなかった。これらの結果から, “Sgs1 の N 末端領域と Top3 が結合し, Rad51 に依存した Rad52 経路で協調的に機能することが, 相同組換えの誘導に必須である”ということが明らかになった。

審査結果の要旨

ヒトゲノムには大腸菌のRecQタンパク質に相同性をもつタンパク質をコードする遺伝子が5つ存在する。これらのRECQ遺伝子のうち、3つはヒトゲノム不安定性を示す遺伝病の原因遺伝子である。本研究は出芽酵母RECQ遺伝子SGS1に着目し、sgs1遺伝子破壊株の解析を通じてヒトRecQの機能欠損により生じる遺伝病の原因を分子レベルで解明することを目指したものである。

SGS1は、DNAトポイソメラーゼ III (TOP3) と遺伝学的に相互作用する遺伝子として同定され、これらの遺伝子によりコードされるタンパク質、Sgs1とTop3との間に何らかの機能的関係があることが示唆されていたが、Sgs1とTop3が実際にどのような過程に関与しているのか不明であった。本研究ではまずはじめに、両者の相互作用を解析し、Top3がSgs1のN末端領域1-45アミノ酸残基で結合することを見いだした。この領域にミスセンス変異を導入すると、DNA傷害剤であるmethyl methanesulfonate (MMS) に対して感受性になり、組換え頻度亢進を抑制することができなくなったことから、Sgs1の機能の発現にはTop3との結合が不可欠であることが明らかになった。

次に、Sgs1のMMS感受性抑制機能は、Sgs1がDNAの二本鎖切断形成を抑制することによるのか、あるいは二本鎖切断の修復に関与するためであるのかを調べるために、MMSで傷害を受けた細胞の染色体DNAをパルスフィールドゲル電気泳動により分離して観察することにより検討した。その結果、Sgs1はMMSにより形成されたDNA二本鎖切断の修復過程に関与することが明らかになった。この二本鎖切断は“Rad52相同組換え経路”と“Ku70が機能する非相同組換え経路”で修復され则认为られている。そこで、二本鎖切断の修復に関与する種々のタンパク質との機能的関連を遺伝学的に解析し、Sgs1は“Rad51の機能に依存する経路”に属し、“Rad51の機能に依存しない経路”に属すMre11とは独立した役割をRad52相同組換え経路で果たしていることを証明した。

最後に、Sgs1がMMSで誘導される相同染色体間の組換え(HR)や姉妹染色分体間の組換え(SCR)に関わっているかを検討し、Sgs1がTop3とともにHRやSCRにおいてRad52経路の一員として機能していることを明らかにした。また、Sgs1のヘリカーゼ活性はこれらの組換えに必ずしも必須ではないという新しい知見を得た。

以上のように、本研究はSgs1の機能及び、Sgs1とTop3との機能的関連に関する理解を大きく進展させるものであり、また、高等真核細胞のRecQファミリータンパク質の機能の解明にも大きく貢献するものである。よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として合格と認める。